

CA 02381173 2002-02-04

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11021 A1

PCT

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/10, C12P 21/02, C12N 9/64, C07K 14/745
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00197
- (22) Internationales Anmeldedatum:
5. August 1999 (05.08.1999)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REITER, Manfred [AT/AT]; Gebrüder-Lang-Gasse 11/17, A-1150 Wien (AT). MUNDT, Wolfgang [AT/AT]; Florianigasse 57/1/2/6, A-1080 Vienna (AT). DÖRNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT).
- (74) Anwälte: SONN, Helm ut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOMBINANT STABLE CELL CLONE, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTER STABILER ZELLKLON, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a stabile recombinant cell clone which is stabile in a medium containing no serum and proteins for at least 40 generations, and to a biomass which is obtained by multiplying the stabile cell clone under cultivation conditions that do not involve the use of serum or proteins. The invention also relates to a method for producing recombinant proteins using the biomass, to a method for producing stabile recombinant cell clones, and to the production of a recombinant protein in a synthetic minimal medium that does contain serum or proteins.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein stabiler rekombinanter Zellklon, der im serum- und proteinfreien Medium für mindestens 40 Generationen stabil ist, eine Biomasse erhalten durch Vermehrung des stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Kultivierungsbedingungen und ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mittels der Biomasse. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen rekombinanten Zellklonen. Weiters betrifft die Erfindung die Herstellung eines rekombinanten Proteins in einem serum- und proteinfreien synthetischen Minimalmedium.

WO 01/11021 A1

CA 02381173 2002-02-04

3

The present invention relates to a stable recombinant cell clone which is stable in a serum- and protein-free medium for at least 40 generations, a biomass obtained by the propagation of the stable cell clone under serum- and protein-free culture conditions and a method for the preparation of recombinant proteins by means of the biomass. Moreover, the invention relates to a method for the preparation of stable recombinant cell clones. Furthermore, the invention relates to the preparation of a recombinant protein in a serum- and protein-free synthetic minimal medium.

The preparation of recombinant proteins, in particular biomedical products, such as blood factors, is becoming increasingly important. To allow optimal growth of recombinant cells, serum is usually added to the medium. Because of the high cost of the serum and to prevent possible contaminations by viral or molecular pathogens through the serum in the culture medium, a number of serum-free media have been developed, which, in particular, should not contain any additives of bovine or human origin. The use of such media in the preparation process allows not only a low risk of contamination of the prepared products by viral and molecular pathogen, but also a more simple purification of the expressed proteins.

Recombinant cells are mostly cultivated* in the serum-containing medium until a high cell density, approximately equivalent to that of a "working cell bank," has been reached, and then, during the production phase, they are readapted to serum-free medium.

Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 3:133-140) selected a serum-independent cell clone in a serum-free medium which contained insulin and transferrin. However, it was shown that, after 16 days, the viable count and the expression rate continuously decreased. Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 4:173-180) attempted to improve the expression rate and the productivity of the recombinant cells by coamplification with a marker gene.

Yamauchi et al. (1992, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:600-604) established serum-independent recombinant CHO subclones by culturing serum dependent cells on microtiter plate as a monolayer for 3-4 weeks in a serum-free medium which contained human serum albumin, insulin and transferrin. Approximately 0.1% of the cells were serum-independent. A portion of the subclones also grew in suspension culture in a serum-free medium, where the cells, however, formed aggregates and clumps. The doubling time of the cells was 1.5 days. However, no indications are provided on the stability of the serum-independent clones obtained or on the long-term culturing of these clones under serum-free conditions.

The media which allowed the maintenance of the metabolic activity and growth of cells during the cell free phase often contained additional substances, such as growth factors, insulin or transferrin, or adherence factors which replace the serum components.

* [Editor's note: This is an unusual translation of "angiebien"]

CA 02381173 2002-02-04

4

In order to omit the addition of polypeptide factors, such as insulin or transferrin, and to allow protein-free culture conditions, various techniques have been developed. For example, specifically defined, complete protein-free media have been developed which allow cell growth even under protein-free conditions.

WO 97/05240 describes the preparation of recombinant proteins under protein-free conditions where the cells coexpress a growth factor in addition to the desired protein.

JP 2696001 describes the use of protein-free media for the preparation of factor VIII in CHO cells with the addition of a nonionic surfactant or cyclodextrin to improve the productivity of the host cells. To increase the effectiveness of these additives, it has been recommended, for example, to add butyrate and lithium.

WO 96/26266 describes the culturing of cells in a medium which contains a glutamine-containing protein hydrolysate, whose free amino acid content is less than 15% of the total protein weight and whose peptide has a molecular weight of less than 44 kd. A synthetic minimal medium is used as base medium in the culturing media for cell cultures, to which base medium one also adds, besides protein hydrolysate, other additives, including fetal calf serum, gentamicin and mercaptoethanol. The use of this serum-containing medium for the recombinant preparation of blood factors is not mentioned.

US 5,393,668 describes special synthetic surfaces which allow the growth of adherent cells under protein-free conditions.

To stimulate the cell proliferation, CHO cells which overexpress human insulin were propagated on an artificial substrate to which the covalent insulin is bound (Ito et al., 1996, PNAS USA 93:3598-3601).

Reiter et al. (1992, Cytotechnology 9:247-253) describe the immobilization of r-CHO cells which are cultured in the serum-containing medium at a high density on supports and the subsequent perfusion of the immobilized cells in the protein-free medium during the production phase, where a continuous release of protein into the cell supernatant was observed. However, the cells were perfused for less than 10 generations in the protein-free medium.

The methods which are available to date for the successful preparation of an industrial "large-scale" cell culture under protein-free conditions have been described for continuous cell lines, particularly VERO cells (WO 96/15231). The cells were cultivated here under serum- and protein-free conditions from the original ampule to the industrial scale of 1200 L. However, the cells used are not recombinant cells, but host cells which are used for the production of virus antigen in a lytic process.

In contrast to adherent VERO cells, CHO cells, for example, are only dependent to a limited degree on adhesion. CHO cells which are cultured by conventional methods under serum-containing conditions are capable of binding both to smooth and porous microsupports (US

CA 02381173 2002-02-04

5

4,978,616, Reiter et al., 1992, Cytotechnology 9:247-253). If CHO cells are grown under serum-free conditions, they lose this property and do not adhere to smooth supports, such as, for example, Cytodex 3, or they readily separate from them to the extent that no adherence-promoting additives, such as, for example, fibronectin, insulin or transferrin have been added to the medium. Because of the low adhesion of CHO cells to supports under serum-free conditions, the production of recombinant proteins is therefore usually carried out in suspension culture. The production process can here be run by a continuous or batch method. The recombinant cell culture is here cultivated in a bioreactor until an optimal cell density has been reached; the protein expression is optionally induced, and, for the harvest, the medium which contains the expressed proteins but also recombinant cells is drawn off at certain intervals from the reaction tank and thus removed from the production process. As a result of the continuous loss of biomass, the production efficiency in the bioreactor decreases, and it increases only after the slow addition of fresh medium, because the cells have to grow until the desired cell density is reached. Therefore, and in spite of the continuous process, there is always a delay phase in which the production rate decreases in this system. In addition, the capacities for growth and production are limited by the maximum achievable cell density in such a system.

In the adaptation of cells cultured under serum-containing conditions on protein-free medium, it was consistently observed that the yield of expressed protein and the productivity of recombinant CHO cells strongly decrease after adaptation in a protein-free medium in comparison to serum-containing conditions (Paterson et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-658).

This is explained by an instability or reduced growth of the recombinant clone as a result of changes in the culture conditions. Because of the changed fermentation conditions—and in spite of the use of a stable original clone—a large portion of the cells is always converted to cells with reduced expression or to nonproducing cells, which, during the production process, overgrow product-producing cells, resulting in a fermentation culture which, in the end, consists of a large portion of nonproducing cells or of cells with low expression.

The result of this situation is that the maximum production capacity of the fermentation culture continuously decreases and the maximum product production is limited to a certain number of generations or cell passages.

Therefore there is a need for a system which allows continuous production over as long a time period as possible, in particular in the industrial production of recombinant proteins under serum- and protein-free conditions.

Moreover, it would be desirable to obtain recombinant cell clones which are stable over many generations in the production phase under protein-free conditions and which expresses a recombinant protein. Therefore the problem of the present invention is to provide an efficient

CA 02381173 2002-02-04

6

method for the preparation of recombinant proteins under serum- and protein-free culture and production conditions.

An additional goal is to provide a stable recombinant cell clone.

According to the invention, the problem is solved by making available a recombinant cell clone which can be obtained from a cell culture, which cell clone is obtained after the culturing of the recombinant original cell clone on serum-containing medium and readaptation of the cells to a serum- and protein-free medium. Here, the cells are further cultured for at least 40 generations in a serum- and protein-free medium under conditions equivalent to the production conditions.

The cell clone according to the invention therefore forms a population of cells which, in a predominant portion, can be cultured for at least 40 generations in a stable manner in the serum- and protein-free medium. Here, it is preferred that more than 80%, in particular more than 99%, of the cell population according to the invention or the cell clone according to the invention is stable for at least 40 generations.

Here it is preferred for the culturing of the cells to be carried out without selection for the selection marker and/or amplification gene, for example, in the absence of MTX in the case of CHO-dhfr⁻ cells.

In the context of the invention, the term original cell clone denotes a recombinant cell clone transfectant, which, after transfection of host cells with a recombinant nucleotide sequence expresses recombinant product in a stable manner under laboratory conditions. The original clone is cultured for growth optimization in the serum-containing medium. To increase the productivity, the original clone is optionally cultivated in the presence of a selection agent and with selection for the selection marker and/or amplification marker. For industrial production, the original cell clone is cultivated under serum-containing culturing conditions until a high cell density has been reached, and it is adapted to serum and/or protein-free medium shortly before the production phase. Here, the culturing is preferably carried out without selective pressure.

It was found that under these conditions a large portion, more than 95%, of the cells in such a cell culture which has been readapted to serum- and protein-free medium is converted into non-product-producing cells. By means of immunofluorescence with product-specific antibodies, it was possible to show that, as a function of the generation time of the cells in serum- and protein-free medium, the number of non-producing cells in a culture increases and overgrows the product-producing cells, resulting in a decrease in the production of the culture.

The cell culture which is obtained after readaptation to serum- and protein-free medium is tested for the cell clone of the cell population which produces stable products under serum- and protein-free conditions, optionally in the absence of selective pressure. This can be achieved, for example, by immunofluorescence with specifically labeled antibodies made against the

CA 02381173 2002-02-04

7

recombinant polypeptide or protein. The cells which have been identified as product-producing cells are isolated from the cell culture, and again propagated under serum- and protein-free conditions, which are preferably equivalent to the production conditions. The isolation of the cells can here be achieved by isolation of the cells and testing for product-producing cells. Optionally, the cell culture which contains the stable cells is again tested for stable recombinant clones, which are then isolated from the cell culture and cloned. The stable recombinant cell clones obtained under serum- and protein-free conditions are then further propagated under serum- and protein-free conditions.

The recombinant cell clone according to the invention is characterized, in particular, in that it is stable in serum-free and protein-free medium for at least 40, preferably at least 50, and particularly advantageously more than 60, generations, and expresses a recombinant protein. Here, this stability appears without benefit of aids such as matrices or solid surfaces, for example, as supports. Furthermore, according to the invention it is not required to carry out the culturing using high cell densities.

According to a special aspect of the invention, the stable recombinant cell clone is in an isolated form. Starting from the stable cell clones, a cell culture is obtained under serum- and protein-free conditions by propagation of the stable cells.

The stable recombinant cell clone according to the invention is preferably derived from a recombinant mammalian cell. Here, the recombinant mammalian cells can be any cells which contain sequences coding for a recombinant polypeptide or protein. This definition comprises all continuously growing cells, both adherent and non-adherent. It is particularly preferred to use recombinant CHO cells or BHK cells. The recombinant polypeptides or proteins can be blood factors, growth factors and other biomedically relevant products.

According to the present invention, it is preferred to use stable recombinant cell clones which contain the coding sequence for a recombinant blood factor such as factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, protein S, protein C, an activated form of one of these factors, or vWF, and which are capable of expressing these blood factors under stable conditions over several generations. Here, it is preferred to use CHO cells which express vWF or a polypeptide with vWF activity, factor VIII or a polypeptide with VIII activity, vWF and factor VIII, factor IX or factor II.

The cell clone which was selected under serum- and protein-free conditions according to the invention is characterized, in particular, in that it is stable for at least 50 [sic; 40], preferably at least 50, generations, and particularly advantageously for more than 60 generations in serum- and protein-free medium.

In order to develop a master cell bank, 30 generations are needed. To carry out an average batch culture on the 1000 L scale, at least 40 generations are required. Thus, for the first

CA 02381173 2002-02-04

8

time it is possible to prepare from an individual clone a "master cell bank" (MCB), a "working cell bank" (WCB) with approximately 8-10 generations and thus to prepare a cell culture on the production scale (production biomass) with up to 20-25 generations under these conditions, because the cell clones available to date became unstable after a few generations of growth on serum- or protein-free medium, resulting in the inability to obtain a) a uniform cell culture with product-producing cells, and b) stable product productivity over a longer time period.

The cell clone according to the invention is thus stable for at least 40 generations under production conditions in serum- and protein-free medium. The methods which have been described to date provided only a generation number of less than 10 generations with product productivity under protein-free conditions (Reiter et al., 1992, supra).

As stability criterion, a minimal number of at least 40 generations, preferably more than 50, and particularly advantageously more than 60, generations are used in the production process, during which stable expression of the proteins occurs and the cell morphology and phenotype do not change and no tumorigenic characteristics are present.

Unexpectedly, it was found that the cell clone according to the invention, under serum- and protein-free conditions, presents an increased productivity even in comparison to the original cell clone which was cultured in serum-containing medium.

According to another aspect, the present invention makes available a cell culture which contains at least 90%, preferably more than 95%, and particularly more advantageously more than 98%, stable recombinant cells which, under serum- and protein-free conditions, are stable for at least 40 generations, in particular at least 50 generations, and express recombinant product.

In the context of the present invention, a cell culture denotes a master cell bank (MCB), a working cell bank (WCB-working cell bank) or a production biomass in an industrial production bioreactor.

According to the invention, the cell culture is obtained, in particular, by culturing a stable recombinant cell clone of the type mentioned above under serum- and protein-free conditions.

The cell culture according to the invention can here be obtained by propagation of the isolated stable cell clone from the individual clone, that is the seed cells, to the MCB, the WCB or a biomass on the production scale in the bioreactor under serum- and protein-free conditions, preferably without selective pressure on the selection and/or marker gene. In particular, it has been shown that the recombinant cells in a cell culture obtained from the stable recombinant clone according to the invention are stable for at least 40 generations under serum- and protein-free conditions.

The cell culture made available according to the present invention, which is prepared from a serum and protein-independent stable cell clone, under most protein-free culturing and production conditions presents at least 90%, preferably at least 95%, particularly advantageously

CA 02381173 2002-02-04

9

at least 98%, stable recombinant cells. The term "stable recombinant cells" here denotes, in particular, recombinant mammalian cells which are derived from the stable cell clone. It is here preferred to use recombinant CHO cells, preferably CHO-dhfr⁻ cells, CHO-K1 cells, and BHK cells which express a blood factor, preferably recombinant vWF, factor VIII, factor VIII and vWF, factor IX or factor II.

The cell culture according to the invention can contain the stable recombinant cells as suspension culture. The cells can also be immobilized on a support, in particular a microsupport, where porous microsupports are particularly preferred. It was found that porous supports such as, for example, Cytoline® or Cytopore®, are particularly suitable.

According to another aspect, the present invention represents a method for the industrial production of a recombinant product under serum- and protein-free conditions, using the stable cell clone made available according to the invention. The method here comprises the steps of preparation of an isolated, stable recombinant cell clone of the above described type for the preparation of a cell culture. Here the propagation of the isolated stable cell clone occurs under serum- and protein-free conditions from the stable individual cell clone to the cell culture. In particular, the subculturing of the stable cell clone also occurs under protein-free conditions, in particular without the addition of a protease such as, for example, trypsin. As a result, it is guaranteed that at no time during the preparation of a cell culture used in the production of a recombinant product that contamination occurs which may under certain circumstances be caused by the addition of serum and protein-containing additives of human or animal origin to the cell culture. Thus, for the first time a method is described which allows the preparation, starting from the initial clone and via the preparation of a working cell bank, a production biomass, and the subsequent production of recombinant protein under serum- and protein-free conditions.

The preparation of the recombinant products with the cell culture according to the invention, which contains more than 90%, preferably more than 95%, and particularly advantageously more than 98%, of stable product-producing cells, can be carried out as suspension culture or with cells immobilized with a support. The process here can be carried out in batch or continuous mode, or by a perfusion technique with serum- and protein-free medium.

The recombinant proteins expressed are then obtained from the cell culture supernatant, then purified with known methods of the state of the art and further processed.

As serum- and protein-free medium one can use any known synthetic medium. Conventional synthetic minimal media can contain inorganic salts, amino acids, vitamins and a carbohydrate source and water. For example, it can be a DMEM/HAM F12 medium. The content of soy and yeast extract can be 0.1-100 g/L, particularly advantageously 1-5 g/L. In a particularly

CA 02381173 2002-02-04

10

preferred embodiment one can use soy extract, for example, soy peptone. The molecular weight of the soy peptone is less than 50 kd, preferably less than 10 kd.

It is particularly preferred to use a medium with the following composition: synthetic minimal medium (1-25 g/L), soy peptone (0.5-50 g/L), L-glutamine (0.05-1 g/L), NaHCO_3 (0.1-10 g/L), ascorbic acid (0.0005-0.05 g/L), ethanolamine (0.0005-0.05 g/L), Na selenite (0.0001-0.01 g/L). A nonionic surfactant such as, for example, polypropylene glycol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 or PLURONIC F108) as defoaming agent can optionally be added to the medium.

This agent is generally used to protect the cells from the negative effects of aeration, because, without the addition of a surfactant, the ascending bursting air bubbles can lead to damage to those cells located on the surface of these air bubbles ("sparging") (Murhammer and Gooch, 1990, Biotechnol. Prog. 6:142-148).

The quantity of nonionic surfactant can here be 0.05-10 g/L, however it is particularly preferred to use as small a quantity as possible of 0.1-5 g/L. Moreover, the medium can also contain cyclodextrin or a derivative thereof.

The addition of the nonionic surfactant or of cyclodextrin is, however, not essential to the invention. It is preferred for the serum- and protein-free medium to contain a protease inhibitor, such as, for example, serine protease inhibitors which are suitable for use in tissue culture and of synthetic or plant origin.

The parameters for the culturing of the cells, such as O_2 concentration, rate of perfusion or change in medium, pH, temperature and culturing technique are here dependent on the individual cell types used and they can be determined in an easy manner by a person skilled in the art. For example, the culturing of CHO cells can be carried out in a stirred vessel and perfusion with protein-free medium can occur at a perfusion rate of 1-10 volume changes/day, a pH of 7.0-7.8, preferably at pH 7.4, an O_2 concentration of 40-60%, preferably 50%, and a temperature of 34-38°C, preferably 37°C.

According to an additional aspect, the present invention makes available a method for the obtention of a stable recombinant cell clone, comprising the steps of

- propagation of a recombinant original clone up to the cell culture in serum-containing medium, preferably without selective pressure,
- culturing the cells under serum- and protein-free conditions which are preferably equivalent to production conditions,
- testing the cell culture for product-producing cells under serum- and protein-free conditions,

CA 02381173 2002-02-04

11

- cloning the stable recombinant cell clone under serum- and protein-free conditions, where the cloning can be carried out by generally known techniques such as isolation of the cells by dilution and growing of the individual clones,

- propagation of the isolated cell clones under serum- and protein-free conditions, and,
- optionally, testing the cell culture for product-producing-cells.

Here only those recombinant cell clones should be considered stable which express stable recombinant protein in a protein-free medium for at least 10, preferably at least 20, and particularly advantageously at least 50 generations.

According to another aspect, the invention makes available a method for the obtention of a stable recombinant cell clone, comprising the steps of

- propagation of a nonrecombinant initial cell or cell line under serum- and protein-free conditions and cloning a stable nonrecombinant cell clone under serum- and protein-free conditions,
- transfecting the stable cell clone with a recombinant nucleic acid and isolation of stable recombinant cell clones,
- culturing the stable cell clone transfectants in a serum- and protein-free medium under conditions which are optionally equivalent to production conditions,
- testing the stable recombinant cells for production and product stability.

The invention is described with reference to the following examples, without being limited to the examples.

Brief description of the figures

Figure 1: shows the microscopic view of a working cell bank of an original clone at the time of the readaptation from serum-containing medium to serum- and protein-free medium (A), after 10 generations in serum- and protein-free medium (B), and after 60 generations in serum- and protein-free medium (C).

Figure 2: shows the microscopic view of a cell culture starting from a stable recombinant cell clone under serum- and protein-free conditions at the stage of the working cell bank (A), after 10 generations (B) and after 60 generations (C).

Figure 3: shows the results of culturing an rFVIII CHO cell clone in a 10 L perfusion bioreactor.

- a) FVIII activity (mU/mL) and perfusion rate (1-5/day) over a time period of 42 days.
 - b) Volumetric productivity (units factor VIII/1/day) in the perfusion bioreactor.
-

CA 02381173 2002-02-04

12

Examples:**Example 1:** Stability of rvWF CHO cells after readaptation from serum-containing medium to serum- and protein-free medium

CHO-dhfr^r cells cotransfected with plasmid phAct-rvWF and pSV-dhfr, and vWF expressing clones, as described in Fischer et al. (1994, FEBS Letters 351:345-348), are subcloned. From the subclones which expressed rvWF in a stable manner, a working cell bank (WCB) was prepared under serum-containing conditions but in the absence of MTX, and the cells were immobilized under serum-containing conditions on a porous microsupport (Cytopore®). After a cell density of 2×10^7 cells/mL support matrix was reached, the conversion of the cells to serum- and protein-free medium was carried out. The cells were further cultured for several generations under serum- and protein-free conditions. By means of immunofluorescence with labeled anti-vWF antibodies, the cells were tested at various times in the serum- and protein-free medium. The evaluation of the stability of the cells was carried out on the working cell bank before the change of medium, after 10 and 60 generations in serum- and protein-free medium. While the working cell bank still presented 100% rvWF producing cells (Figure 1 A), the proportion of rvWF producing cells decreased to approximately 50% after 10 generations in serum- and protein-free medium (Figure 1 B). After 60 generations more than 95% of the cells were identified as nonproducing cells (Figure 1 C).

Example 2: Cloning of stable recombinant CHO clones

From the rvWF CHO cell-containing cell culture according to Example 1, which had been cultured for 60 generations in serum- and protein-free medium (Figure 1 C), a dilution was prepared, and in each case 0.1 cell/well was inoculated in a microtiter plate. The cells were cultured in DMEM/HAM F12 without serum or protein additives and without selective pressure for approximately 3 weeks, and the cells were tested by means of immunofluorescence with labeled anti-vWF antibodies. A cell clone which had been identified as positive was used as starting clone for the preparation of a seed cell bank. From the seed cell bank a master cell bank (MCB) was prepared in serum- and protein-free medium, and individual ampules were frozen and stored for the later preparation of a working cell bank. Starting from an individual ampule, a working cell bank was prepared in serum- and protein-free medium. The cells were immobilized on porous microsupports and continued to be cultured for several generations under serum- and protein-free conditions. By means of immunofluorescence with labeled anti-vWF antibodies, the cells were tested at different times in serum- and protein-free medium for productivity. The evaluation of the stability of the cells was carried out at the stage of the working cell bank and after 10 and 60 generations in serum- and protein-free medium. At the stage of the working cell

CA 02381173 2002-02-04

13

bank (Figure 2A), and after 10 (Figure 2B) and 60 generations (Figure 2C), approximately 100% of the cells were identified as positive stable recombinant clones which express rvWF.

Example 3: Cell specific productivity of the recombinant cell clones

From the defined stage during the culturing of recombinant cells, a defined cell number was removed and incubated with fresh medium for 24 h. The rvWF:Risto-CoF [ristocetin cofactor] activity was determined in the cell culture supernatants. Table 1 shows that the cell-specific productivity in the stable recombinant cell clones according to the invention was stable even after 60 generations in serum- and protein-free medium, and it was elevated even in comparison with the original clone which was cultured in serum-containing medium.

Table 1

Cell clone	Cell specific productivity of the working cells, mU rvWF/10 ⁶ cells/day	Cell specific productivity after 10 generations, mU rvWF/10 ⁶ cells/day	Cell specific productivity after 60 generations, mU rvWF/10 ⁶ cells/day
rvWf-CHO *808.68 original cell clone	55	30	<10
r-vWF-CHO F7 *) stable clone	62	65	60

*) deposited in accordance with the Budapest Treatise of January 22, 1998 (ECAC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK), deposit No. 98012206)

Example 4: Culturing of rFVIII CHO cells in protein and serum-free minimal medium

An rFVIII CHO cell-containing cell culture was cultured in a 10 L stirred tank and perfused. Thereby a serum- and protein-free medium was used. The cells were here immobilized on a porous microsupport (Cytopore®, Pharmacia) and cultured for at least 6 weeks. The perfusion rate was 4 volume changes/day, the pH was 6.9-7.2, the O₂ concentration approximately 20-50%, and the temperature 37°C.

Figure 3 shows the results of culturing an rFVIII CHO cell clone in a 10 L perfusion bioreactor.

- FVIII activity (mU/mL) and perfusion rate (1-5/day) over a time period of 42 days.
- Volumetric productivity (units factor VIII/L/day) in the perfusion bioreactor.

CA 02381173 2002-02-04

14

Table 2

Culturing days	Cell specific productivity (mU/10 ⁶ cells/day)	Immunofluorescence (% FVIII positive cells)
15	702	n.a.
21	1125	n.a.
28	951	>95%
35	691	>95%
42	970	n.a.

Table 2 shows the stability and specific productivity of the rFVIII expressing cells. For these results, samples were removed after 15, 21, 28, 35 and 42 days, centrifuged at 300 G and resuspended in fresh serum- and protein-free medium. After an additional 24 h, the factor VIII concentration in the cell culture supernatants and the cell count were determined. From these data, the specific FVIII productivity was calculated.

A stable average productivity of 888 mU/10⁶ cells/day was reached. This stable productivity was also confirmed by immunofluorescence with labeled anti-FVIII antibodies after 15, 21, 28, 35 and 42 days in serum- and protein-free medium.

Claims

1. Recombinant cell clone, characterized in that it is stable in a serum- and protein-free medium for at least 40, preferably 50, generations and expresses recombinant product.
2. Cell clone according to Claim 1 or 2, characterized in that it is in an isolated form.
3. Cell clone according to one of Claims 1-3 [sic], characterized in that it is derived from a recombinant mammalian cell.
4. Cell clone according to Claim 3, characterized in that the mammalian cell is a recombinant CHO cell or a BHK cell.
5. Cell clone according to one of Claims 1-4, characterized in that it contains sequences coding for a recombinant polypeptide or protein.
6. Cell clone according to Claim 5, characterized in that the recombinant protein is a blood factor chosen from the group consisting of factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, protein S, protein C, or an activated form of one of the factors, or vWF.
7. Cell clone according to one of Claims 1-6, characterized in that the cell is a recombinant CHO cell which expresses von Willebrand's factor.

CA 02381173 2002-02-04

18

Claims

1. Method for the preparation of a stable recombinant cell clone, characterized by the following steps:

- preparation of a recombinant original cell clone,
- culturing of the recombinant original cell clone on serum-containing medium,
- readaptation of the cells to serum- and protein-free medium,
- testing of the cell culture for stable product-producing cells, and
- cloning of a stable product-producing cell clone under serum- and protein-free

conditions.

2. Method according to Claim 1, characterized in that, after cloning, the stable cell clone is obtained in isolated form.

3. Method according to Claim 1 or 2, characterized in that a recombinant mammalian cell is prepared as the original clone.

4. Method according to Claim 3, characterized in that the mammalian cell is a recombinant CHO cell or a BHK cell.

5. Method according to one of Claims 1-4, characterized in that the recombinant cell clone contains the sequences coding for a recombinant polypeptide or protein.

6. Method according to Claim 5, characterized in that the recombinant protein is a blood factor chosen from the group consisting of factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, protein S, protein C, or an activated form of one of the factors, or vWF.

7. Method according to one of Claims 1-6, characterized in that, as the original clone, a recombinant CHO cell which expresses von Willebrand's factor is prepared.

8. Method according to one of Claims 1-6, characterized in that, as the original clone, a recombinant CHO cell which expresses factor VIII is prepared.

9. Method according to one of Claims 1-6, characterized in that, as the original clone, a recombinant CHO cell with coexpresses factor VIII and vWF is prepared.

10. Method according to one of Claims 1-6, characterized in that, as the original clone, a recombinant CHO cell which expresses factor IX is prepared.

11. Method according to one of Claims 1-6, characterized in that, as the original clone, a recombinant CHO cell which expresses factor II is prepared.

CA 02381173 2002-02-04

19

12. Recombinant cell clone, characterized in that it can be prepared by a method according to one of Claims 1-11.

13. Cell culture, characterized in that it can be obtained by the following steps:

- propagation of a recombinant original clone in serum-containing medium,
- culturing of the cell under serum- and protein-free conditions up to the cell culture,
- testing of the cell culture under serum- and protein-free conditions for product-producing cells,

- cloning of stable cell clones under serum- and protein-free conditions,

- propagation of stable cell clones under serum- and protein-free conditions.

14. Cell culture, characterized in that it can be obtained by culturing a stable recombinant cell clone according to Claim 12.

15. Cell culture according to Claim 13 or 14, characterized in that it can be induced to express recombinant product under serum- and protein-free conditions.

16. Cell culture according to one of Claims 13-15, characterized in that the stable recombinant cell clones are mammalian cells.

17. Cell culture according to Claim 16, characterized in that the mammalian cells are CHO cells, preferably CHO-DHFR⁺ cells, CHO-K1 cells or BHK cells.

18. Cell culture according to one of Claims 13-17, characterized in that the stable recombinant cells contain a sequence coding for a recombinant polypeptide or protein.

19. Cell culture according to one of Claims 13-18, characterized in that the cells are immobilized on a microsupport.

20. Method for the industrial production of a recombinant product under serum- and protein-free conditions, characterized in that it comprises the following steps:

- preparation of an isolated, stable recombinant cell clones according to Claim 12,
- propagation of the stable cell clone in serum- and protein-free medium from the initial clone up to the cell culture,
- preparation of the stable cell-containing cell culture in the bioreactor, and
- harvesting of the proteins from the culture supernatant.

21. Method according to Claim 20, characterized in that the serum- and protein-free medium is a synthetic minimal medium containing a yeast or soy extract.

22. Method according to Claims 20 or 21, characterized in that the medium contains cyclodextrin or a derivative thereof.

23. Method according to Claim 20-22, characterized in that the serum- and protein-free medium contains a protease inhibitor.

24. Method for the obtention of a stable recombinant cell clone, characterized in that it comprises the following steps:

CA 02381173 2002-02-04

20

- propagation of a recombinant original clone up to the cell culture in serum-containing medium,
- culturing of the cells under serum- and protein-free conditions which are equivalent to production conditions,
- testing of the cell culture for product-producing cells under serum- and protein-free conditions,
- cloning of the recombinant cell clones which are stable under serum- and protein-free conditions, and
- propagation of the stable cell clone under serum- and protein-free conditions.

25. Method for the obtention of a stable recombinant cell clone, characterized in that it comprises the following steps:

- propagation of a nonrecombinant starting cell under serum- and protein-free conditions,
 - cloning of a stable nonrecombinant cell clone under serum- and protein-free conditions,
 - transfection of the stable cell clone with a recombinant nucleic acid and isolation of stable transfectants, culturing of the transfectants in serum- and protein-free medium under conditions which are equivalent to production conditions, and testing of the cells for production stability.
-

CA 02381173 2002-02-04

Application number / numéro de demande: AT99/00197

Figures: #1, abc #2, abc

Unscannable items
received with this application
(Request original documents in File Prep. Section on the 10th floor)

Documents reçu avec cette demande ne pouvant être balayés
(Commander les documents originaux dans la section de préparation des dossiers au
10^{ème} étage)

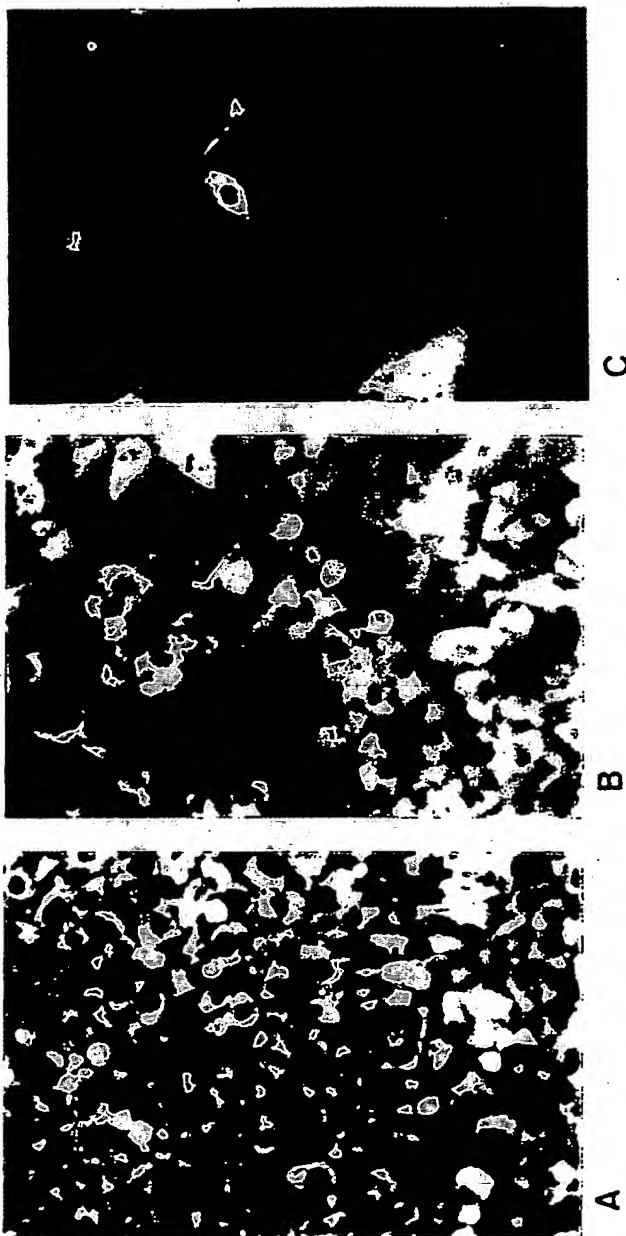
CA 02381173 2002-02-04

WO 01/11021

1/3

PCT/AT99/00197

Fig. 1



BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

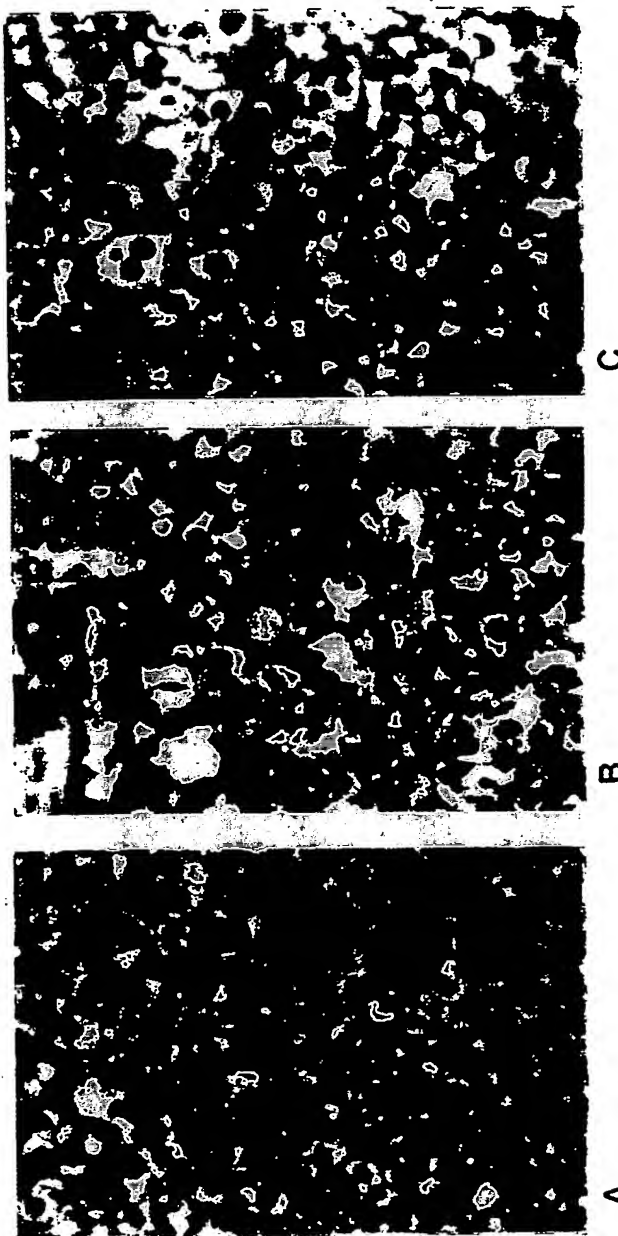
CA 02381173 2002-02-04

WO 01/11021

2/3

PCT/AT99/00197

Fig. 2



BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

CA 02381173 2002-02-04

WO 01/11021

3/3

PCT/AT99/00197

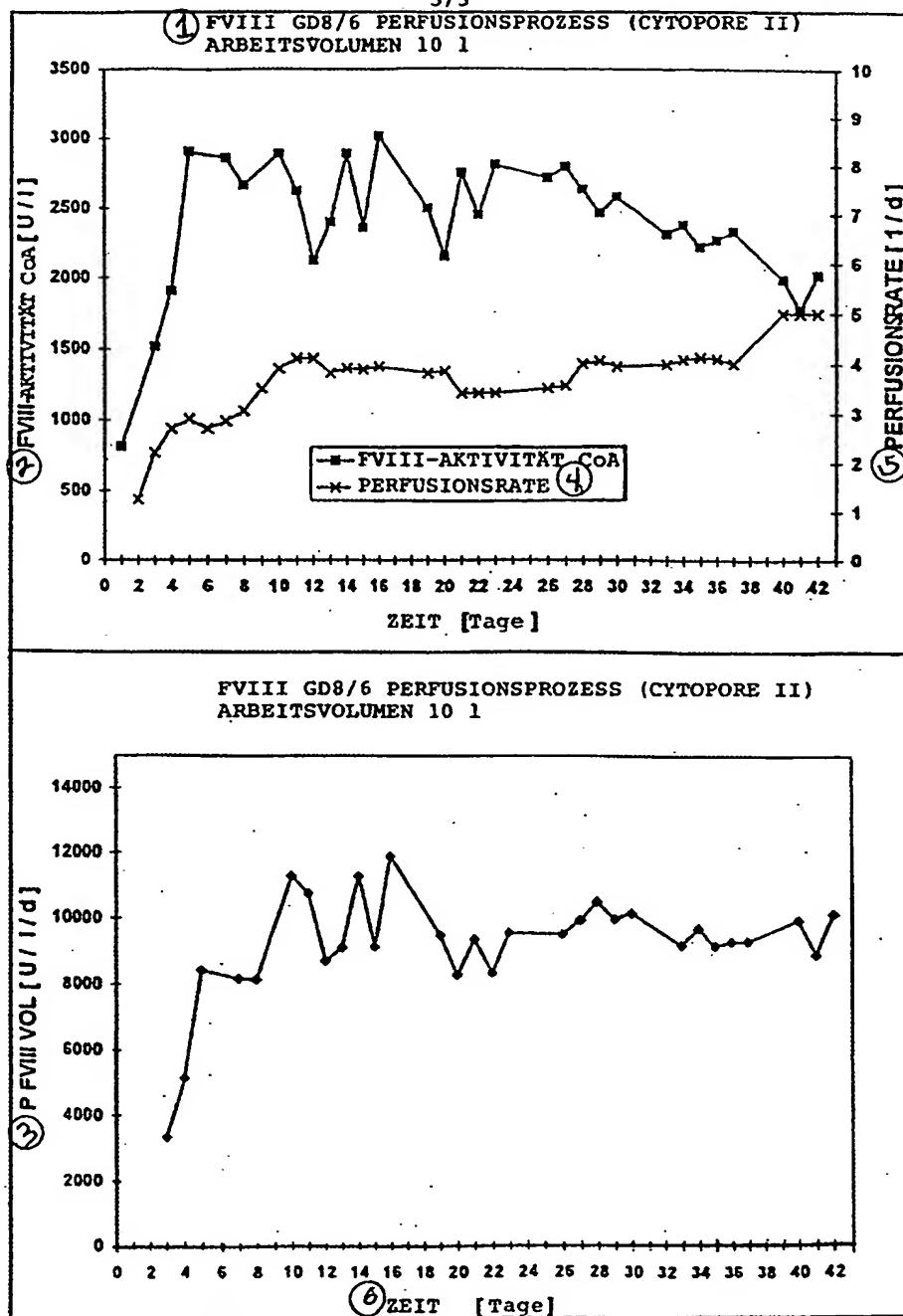


FIG. 3

BEST AVAILABLE COPY

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11021 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 5/10,
C12P 21/02, C12N 9/64, C07K 14/745

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00197

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. August 1999 (05.08.1999)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT];
Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REITER, Man-
fred [AT/AT]; Gebrüder-Lang-Gasse 11/17, A-1150
Wien (AT). MUNDT, Wolfgang [AT/AT]; Florianigasse
57/1/2/6, A-1080 Vienna (AT). DORNER, Friedrich
[AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT).

(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010
Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches
Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), eu-
ropäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOMBINANT STABLE CELL CLONE, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTER STABILER ZELLKLON, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a stabile recombinant cell clone which is stabile in a medium containing no serum and proteins for at least 40 generations, and to a biomass which is obtained by multiplying the stabile cell clone under cultivation conditions that do not involve the use of serum or proteins. The invention also relates to a method for producing recombinant proteins using the biomass, to a method for producing stabile recombinant cell clones, and to the production of a recombinant protein in a synthetic minimal medium that does contain serum or proteins.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein stabiler rekombinanter Zellklon, der im serum- und proteinfreien Medium für mindestens 40 Generationen stabil ist, eine Biomasse erhalten durch Vermehrung des stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Kultivierungsbedingungen und ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mittels der Biomasse. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen rekombinanten Zellklonen. Weiters betrifft die Erfindung die Herstellung eines rekombinanten Proteins in einem serum- und proteinfreien synthetischen Minimalmedium.

WO 01/11021 A1

REKOMBINANTER STABILER ZELLKLON, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft einen stabilen rekombinanten Zellklon, der im serum- und protein-freien Medium für mindestens 40 Generationen stabil ist, eine Biomasse erhalten durch Vermehrung des stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Kultivierungsbedingungen und ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mittels der Biomasse. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen rekombinanten Zellklonen. Weiters betrifft die Erfindung die Herstellung eines rekombinanten Proteins in einem serum- und protein-freien synthetischen Minimalmedium.

Die Herstellung von rekombinanten Proteinen, insbesondere von biomedizinischen Produkten, wie Blutfaktoren, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Um ein optimales Wachstum von rekombinanten Zellen zu ermöglichen, wird dem Medium zumeist Serum zugegeben. Aufgrund der hohen Kosten von Serum und um mögliche Verunreinigungen durch virale oder molekulare Pathogene durch das Serum im Kultivierungsmedium zu vermeiden, wurde eine Reihe von serum-freien Medien entwickelt, die insbesondere keine Zusätze bovinen oder humanen Ursprungs enthalten sollten. Die Verwendung solcher Medien beim Herstellungsprozeß erlaubt neben der geringen Kontaminationsgefahr der hergestellten Produkte durch virale und molekulare Pathogene auch eine einfachere Reinigung der exprimierten Proteine.

Rekombinante Zellen werden zumeist in serumhaltigem Medium bis zu einer hohen Zelldichte, etwa für eine "Working cell bank" angezogen, und anschließend während der Produktionsphase auf serumfreies Medium umadaptiert.

Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 3:133-140) selektionierten serum-unabhängige Zellklone in serumfreiem Medium, das Insulin und Transferrin enthielt. Es zeigte sich jedoch, daß nach 16 Ta-

gen die Lebendzellzahl und die Expressionsrate ständig abnahm. Durch Coamplifikation mit einem Markergen versuchten Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 4:173-180) die Expressionsrate und die Produktivität der rekombinanten Zellen zu verbessern.

Yamauchi et al. (1992, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:600-604) etablierten serum-unabhängige rekombinante CHO-Subklone durch Kultivierung serum-abhängiger Zellen auf Mikrotiterplatten als Monolayer für 3 bis 4 Wochen in serum-freiem Medium, das humanes Serumalbumin, Insulin und Transferrin enthielt. Etwa 0,1% der Zellen waren serum-unabhängig. Ein Teil der Subklone wuchs auch in Suspensionkultur in serumfreiem Medium, wobei die Zellen jedoch aggregierten und klumpten. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug 1,5 Tage. Es werden jedoch weder Angaben über die Stabilität der erhaltenen serum-unabhängigen Klone noch über die Langzeitkultivierung dieser Klone unter serumfreien Bedingungen gemacht.

Medien, die die Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität und ein Wachstum von Zellen während der serumfreien Phase erlauben, enthalten oftmals zusätzlich Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, wie Insulin oder Transferrin, oder Adhärenzfaktoren, die die Serumkomponenten ersetzen.

Um die Zugabe von Polypeptidfaktoren, wie Insulin oder Transferrin, zu vermeiden und proteinfreie Kultivierungsbedingungen zu erlauben, wurden verschiedene Techniken entwickelt. So wurden speziell definierte, komplette proteinfreie Medien entwickelt, die ein Zellwachstum auch unter proteinfreien Bedingungen erlauben.

WO 97/05240 beschreibt die Herstellung von rekombinanten Proteinen unter proteinfreien Bedingungen, wobei die Zellen neben dem gewünschten Protein einen Wachstumsfaktor coexprimieren.

JP 2696001 beschreibt die Verwendung von proteinfreiem Medium für die Herstellung von Faktor VIII in CHO-Zellen unter Zugabe eines nicht-ionischen Oberflächenmittels oder Cyclodextrin zur Steigerung der Produktivität der Wirtszellen. Um die Wirksamkeit

dieser Zusätze zu steigern, wird die Zugabe von beispielsweise Butyrat und Lithium empfohlen.

WO 96/26266 beschreibt die Kultivierung von Zellen in einem Medium, das ein Glutamin enthaltendes Proteinhydrolysat enthält, dessen Gehalt an freien Aminosäuren kleiner als 15% des Gesamtproteingewichts ist und dessen Peptide ein Molekulargewicht von kleiner 44kD aufweisen. Als Kultivierungsmedium für die Zellkulturen wird als Basismedium synthetisches Minimalmedium verwendet, dem neben Proteinhydrolysat auch unter anderem fötales Kälberserum, Gentamycin und Mercaptoethanol zugesetzt wird. Die Verwendung dieses serumhaltigen Mediums für die rekombinante Herstellung von Blutfaktoren wird nicht erwähnt.

US 5,393,668 beschreibt spezielle synthetische Oberflächen, die ein Wachstum von adhären Zellen unter proteinfreien Bedingungen erlauben.

Um die Zellproliferation zu stimulieren, wurden CHO-Zellen, die humanes Insulin überexprimieren, auf einem artifiziellen Substrat, an das kovalent Insulin gebunden ist, vermehrt (Ito et al., 1996, PNAS USA 93:3598-3601).

Reiter et al. (1992, Cytotechnology 9:247-253) beschreiben die Immobilisierung von in serumhaltigem Medium angezüchteten r-CHO-Zellen bei einer hohen Dichte auf Trägern und anschließender Perfusion der immobilisierten Zellen in proteinfreiem Medium während der Produktionsphase, wobei eine kontinuierliche Freisetzung von Protein in den Zellkulturüberstand festgestellt wurde. Die Zellen wurden dabei jedoch für weniger als 10 Generationen in proteinfreiem Medium perfundiert.

Bisherige Verfahren zur erfolgreichen Herstellung einer großtechnischen "large-scale"-Zellkultur unter proteinfreien Bedingungen werden für kontinuierliche Zelllinien, insbesondere VERO-Zellen, beschrieben (WO 96/15231). Die Zellen werden dabei unter serum- und proteinfreien Bedingungen von der Original-Ampulle bis zum großtechnischen Maßstab von 1200 l angezogen. Es handelt sich dabei jedoch nicht um rekombinante Zellen, sondern um

Wirtszellen, die für die Produktion von Virusantigenen in einem lytischen Prozeß eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu adhärenenten VERO-Zellen sind beispielsweise CHO-Zellen nur bedingt haftungsabhängig. Mittels konventioneller Methoden unter serumhaltigen Bedingungen angezogene CHO-Zellen können sowohl an glatte als auch an poröse Mikroträger binden (US 4,978,616, Reiter et al., 1992, Cytotechnology 9:247-253). Werden CHO-Zellen unter serumfreien Bedingungen angezogen, so verlieren sie diese Eigenschaft und haften nicht an glatten Trägern, wie etwa Cytodex 3, oder lösen sich leicht von diesen ab, sofern nicht Adhärenzfördernde Zusätze, wie beispielsweise Fibronektin, Insulin oder Transferrin ins Medium gegeben werden. Aufgrund der geringen Adhärenz von CHO-Zellen an Träger unter serumfreien Bedingungen erfolgt die Produktion von rekombinanten Proteinen daher zumeist in Suspensionskultur. Der Produktionsprozess kann dabei in einem kontinuierlichen oder batch-weisen Verfahren ablaufen. Die rekombinante Zellkultur wird dabei bis zu einer optimalen Zelldichte im Bioreaktor angezogen, gegebenenfalls die Proteinexpression induziert und zum Ernten das Medium enthaltend die exprimierten Proteine, jedoch auch rekombinante Zellen in gewissen Abständen dem Reaktionsstank und damit dem Produktionsprozeß entzogen. Durch den ständigen Verlust an Biomasse sinkt die Produktionseffizienz im Bioreaktor ab und erhöht sich erst nach Zugabe von frischem Medium langsam wieder, da die Zellen auf die gewünschte Zelldichte hochwachsen müssen. Es gibt daher, trotz des kontinuierlichen Prozesses, immer wieder eine Verzögerungsphase, in der die Produktionsrate bei diesem System absinkt. Zudem ist die Wachstums- und Produktionskapazität durch die maximal erreichbare Zelldichte in einem solchen System begrenzt.

Bei der Adaptierung von unter serumhaltigen Bedingungen angezüchteten Zellen auf proteinfreies Medium wurde immer wieder festgestellt, daß die Ausbeute an exprimiertem Protein und die Produktivität von rekombinanten CHO-Zellen nach Adaption in proteinfreiem Medium im Vergleich zu serumhaltigen Bedingungen stark absinkt (Paterson et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-658).

Dies ist auf eine Instabilität oder reduziertes Wachstum der rekombinanten Klone aufgrund der geänderten Kulturbedingungen zurückzuführen. Aufgrund der veränderten Fermentationsbedingungen wird - trotz Einsetzen eines stabilen Ursprungsklons - immer wieder ein Großteil der Zellen zu Zellen mit verringerter Expression oder auch Nicht-Produzenten, die während des Produktionsprozesses Produkt-Produzenten überwuchern, wodurch die Fermenterkultur letztlich zu einem Großteil aus Nicht-Produzenten bzw. solchen Zellen mit geringer Expression besteht.

Dies hat zur Folge, daß die maximale Produktionskapazität der Fermentationskultur kontinuierlich absinkt und eine maximale Produktproduktion auf eine bestimmte Anzahl von Generationen oder Zellpassagen beschränkt ist.

Es besteht daher ein Bedarf an einem System, bei dem eine kontinuierliche Produktion, insbesondere bei der großtechnischen Herstellung von rekombinanten Proteinen unter serum- und proteinfreien Bedingungen über einen möglichst langen Zeitraum möglich ist.

Es wäre weiterhin wünschenswert, einen rekombinanten Zellklon zu erhalten, der für viele Generationen in der Produktionsphase unter proteinfreien Bedingungen stabil ist und rekombinantes Protein exprimiert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes Verfahren für die Herstellung von rekombinanten Proteinen unter serum- und proteinfreien Kultivierungs- und Produktionsbedingungen zur Verfügung zu stellen.

Eine weiteres Ziel ist es, einen stabilen rekombinanten Zellklon zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch Zurverfügungstellen eines rekombinanten Zellklons, erhältlich aus einer Zellkultur, die nach Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium und Umadaptierung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium erhalten wird. Die Zellen werden

dabei für mindestens 40 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium unter produktionsäquivalenten Bedingungen weiterkultiviert.

Der erfindungsgemäße Zellklon bildet daher eine Population von Zellen, die zum überwiegenden Teil für mindestens 40 Generationen stabil im serum- und proteinfreien Medium kultiviert werden kann. Vorzugsweise sind dabei mehr als 80%, insbesondere mehr als 99% der Zellen der erfindungsgemäßen Zellpopulation bzw. des erfindungsgemäßen Zellklons für mindestens 40 Generationen stabil.

Vorzugsweise erfolgt die Kultivierung der Zellen dabei ohne Selektion auf das Selektionsmarker- und/oder Amplifikationsgen, beispielsweise in Abwesenheit MTX bei CHO-dhfr⁻-Zellen.

Unter Ursprungszellklon wird im Rahmen dieser Erfindung ein rekombinanter Zellklon-Transfektant verstanden, der nach Transfektion von Wirtszellen mit einer rekombinanten Nukleotidsequenz unter Laborbedingungen stabil rekombinantes Produkt exprimiert. Der Ursprungsklon wird zur Optimierung des Wachstums in serumhaltigem Medium angezüchtet. Zur Erhöhung der Produktivität wird der Ursprungsklon gegebenenfalls in Gegenwart eines Selektionsmittels und Selektion auf den Selektionsmarker und/oder Amplifikationsmarker angezogen. Für die großtechnische Produktion wird der Ursprungszellklon unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen bis zu einer hohen Zelldichte angezogen und kurz vor der Produktionsphase auf serum- und/oder proteinfreies Medium umadaptiert. Die Kultivierung erfolgt dabei vorzugsweise ohne Selektionsdruck.

Es wurde gefunden, daß unter diesen Bedingungen ein Großteil von mehr als 95% der Zellen in einer solchen auf serum- und proteinfreiem Medium umadaptierten Zellkultur zu Nicht-Produkt-Produzenten werden. Mittels Immunfluoreszenz mit produkt-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß abhängig von der Generationszeit der Zellen in serum- und proteinfreiem Medium die Anzahl der Nicht-Produzenten in einer Kultur ansteigt und die Produkt-Produzenten überwächst, wodurch die Produktionskapazität

der Kultur absinkt.

Die nach Umadaptierung auf serum- und proteinfreies Medium erhaltene Zellkultur wird auf diejenigen Zellklone der Zellpopulation getestet, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen, gegebenenfalls in Abwesenheit eines Selektionsdruckes, stabile Produkte produzieren. Dies kann beispielsweise durch Immunfluoreszenz mit markierten, spezifischen, gegen das rekombinante Polypeptid oder Protein gerichteten Antikörpern erfolgen. Die als Produkt-Produzenten identifizierten Zellen werden aus der Zellkultur isoliert, und unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen erneut vermehrt. Die Isolierung der Zellen kann dabei durch Vereinzeln der Zellen und Testen auf Produkt-Produzenten erfolgen. Gegebenenfalls wird die Zellkultur, enthaltend die stabilen Zellen, erneut auf stabile rekombinante Klone getestet und diese aus der Zellkultur isoliert und auskloniert. Anschließend werden die unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhaltenen stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen weitervermehrt.

Der erfindungsgemäße rekombinante Zellklon zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er in serumfreiem und proteinfreiem Medium für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50, insbesondere mehr als 60, Generationen stabil ist und rekombinantes Produkt exprimiert. Dabei zeigen sie diese Stabilität ohne daß sie durch Hilfsmittel wie Matrizen oder feste Oberflächen z.B. als Träger unterstützt werden müßten. Auch ist eine Züchtung in hohen Zelldichten erfindungsgemäß nicht erforderlich.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung liegt der stabile rekombinante Zellklon in isolierter Form vor. Ausgehend vom stabilen Zellklon wird unter serum- und proteinfreien Bedingungen eine Zellkultur durch Vermehrung der stabilen Zellen gewonnen.

Der erfindungsgemäße stabile rekombinante Zellklon ist vorzugsweise von einer rekombinanten Säugerzelle abgeleitet. Rekombinante Säugerzellen können dabei alle Zellen sein, die für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierende Sequenzen ent-

halten. Umfaßt sind dabei alle kontinuierlich wachsenden Zellen, die sowohl adhärent als auch nicht-adhärent wachsen. Besonders bevorzugt sind rekombinante CHO-Zellen oder BHK-Zellen. Rekombinante Polypeptide oder Proteine können Blutfaktoren, Wachstumsfaktoren oder andere biomedizinisch relevante Produkte sein.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind stabile rekombinante Zellklone bevorzugt, die die kodierende Sequenz für einen rekombinanten Blutfaktor wie Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C, eine aktivierte Form eines dieser Faktoren, oder vWF enthalten, und in der Lage sind, diesen stabil über mehrere Generationen zu exprimieren. Besonders bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, die vWF oder ein Polypeptid mit vWF-Aktivität, Faktor VIII oder ein Polypeptid mit VIII-Aktivität, vWF und Faktor VIII, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Der unter serum- und proteinfreien Bedingungen selektionierte erfindungsgemäße Zellklon zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er für mindestens 50, vorzugsweise für mindestens 50 Generationen, besonders bevorzugt für mehr als 60 Generationen, in serum- und proteinfreiem Medium stabil ist.

Um eine Mastzellbank anzulegen, werden 30 Generationen benötigt. Um eine durchschnittliche Batchkultur mit 1000 Liter-Maßstab durchzuführen, sind mindestens etwa 40 Generationen erforderlich. Damit ist es erstmals möglich, ausgehend von einem Einzelklon eine "Master cell bank" (MCB), eine "Working cell bank" (WCB) mit etwa 8 bis 10 Generationen und damit eine Zellkultur im Produktionsmaßstab (Produktionsbiomasse) mit bis zu 20 bis 25 Generationen unter diesen Bedingungen herzustellen, da bisherige Zellklone einige Generationen nach Wachstum auf serum- oder proteinfreiem Medium instabil wurden; wodurch a) keine einheitliche Zellkultur mit Produkt-Produzenten und b) keine stabile Produktproduktivität über einen längeren Zeitraum möglich war.

Der erfindungsgemäße Zellklon ist damit unter Produktionsbedingungen in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40 Generationen stabil. Bisher beschriebene Verfahren zeigten ledig-

lich eine Generationszahl von weniger als 10 Generationen Produktproduktivität unter proteinfreien Bedingungen (Reiter et al., 1992, supra).

Als Stabilitätskriterium gilt eine Mindestanzahl von mindestens 40 Generationen, vorzugsweise mehr als 50, besonders bevorzugt mehr als 60 Generationen im Produktionsprozeß, während der eine stabile Expression der Proteine stattfindet und sich die Zellen morphologisch-phänotypisch nicht verändern und keine tumorogenen Eigenschaften aufweisen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß der erfindungsgemäße Zellklon unter serum- und proteinfreien Bedingungen eine erhöhte Produkt-Produktivität selbst im Vergleich zum Ursprungszellklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert wurde, aufweist.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Zellkultur zur Verfügung, die mindestens 90%, vorzugsweise mehr als 95%, besonders bevorzugt mehr als 98%, stabile rekombinante Zellen enthält, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen für mindestens 40 Generationen, insbesondere für mindestens 50 Generationen, stabil sind und rekombinantes Produkt exprimieren.

Unter Zellkultur wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Master Cell Bank (MCB), eine Working Cell Bank (WCB-Arbeitszellbank) oder eine Produktionsbiomasse in einem großtechnischen Produktionsbioreaktor verstanden.

Erfindungsgemäß wird die Zellkultur insbesondere durch Kultivieren eines stabilen rekombinanten Zellklons der oben beschriebenen Art unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhalten.

Die erfindungsgemäße Zellkultur ist dabei erhältlich durch Vermehren des isolierten stabilen Zellklons vom Einzelklon, der Saatzellen bis zur der MCB, der WCB oder einer Biomasse im Produktionsmaßstab im Bioreaktor unter serum- und proteinfreien Bedingungen, vorzugsweise ohne Selektionsdruck auf das Selektions- und/oder Markergen. Es hat sich insbesondere gezeigt, daß

die rekombinanten Zellen in einer Zellkultur, die ausgehend vom erfindungsgemäßen stabilen rekombinanten Klon erhalten werden, für mindestens 40 Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen stabil sind.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellte Zellkultur, die von einem serum- und proteinunabhängigen stabilen Zellklon hergestellt ist, weist unter proteinfreien Kultivierungs- und Produktionsbedingungen mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98%, stabile rekombinante Zellen auf. Unter stabilen rekombinanten Zellen werden dabei insbesondere rekombinante Säugerzellen verstanden, die vom stabilen Zellklon abgeleitet sind. Bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, vorzugsweise CHO-dhfr⁻-Zellen, CHO-K1-Zellen, und BHK-Zellen, die einen Blutfaktor, vorzugsweise rekombinanten vWF, Faktor VIII, Faktor VIII und vWF, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Die erfindungsgemäße Zellkultur kann die stabilen rekombinanten Zellen als Suspensionskultur enthalten. Die Zellen können auch an einen Träger, insbesondere einen Mikroträger, immobilisiert sein, wobei insbesondere poröse Mikroträger bevorzugt sind. Als besonders geeignet haben sich dabei poröse Träger, wie etwa Cytoline® oder Cytopore®, gezeigt.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur großtechnischen Herstellung eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen, unter Einsatz des erfindungsgemäßen stabilen Zellklons zur Verfügung. Das Verfahren umfaßt dabei die Schritte des Bereitstellens eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons der oben beschriebenen Art zur Herstellung einer Zellkultur. Dabei erfolgt die Vermehrung des isolierten stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen vom stabilen Einzel-Zellklon bis zur Zellkultur. Insbesondere erfolgt auch die Subkultivierung der stabilen Zellklone unter proteinfreien Bedingungen, insbesondere ohne Zugabe einer Protease, wie etwa Trypsin. Dadurch ist gewährleistet, daß zu keinem Zeitpunkt während der Herstellung einer in der Produktion eines rekombinanten Produktes eingesetz-

ten Zellkultur, eine Kontamination, gegebenenfalls verursacht durch die Zugabe von serum- oder proteinhaltigen Zusätzen humanen oder tierischen Ursprungs zur Zellkultur, erfolgt. Damit wird erstmals ein Verfahren beschrieben, das vom Ausgangsklon über die Herstellung einer Working cell bank bis zur Produktionsbiomasse und die anschließende Produktion von rekombinantem Protein unter serum- und proteinfreien Bedingungen erlaubt.

Die Herstellung der rekombinanten Produkte mit der erfindungsgemäßen Zellkultur, die mehr als 90%, vorzugsweise mehr als 95%, besonders bevorzugt mehr als 98%, stabile Produktproduzenten-Zellen enthält, kann als Suspensionskultur oder mit an Träger-immobilisierten Zellen erfolgen. Der Prozeß kann dabei im batchweisen, kontinuierlichen Verfahren oder durch Perfusionstechnik mit serum- und proteinfreiem Medium erfolgen.

Die exprimierten rekombinanten Proteine werden anschließend aus dem Zellkulturüberstand gewonnen, mit aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren gereinigt und weiterverarbeitet.

Als serum- und proteinfreies Medium kann jedes bekannte synthetische Medium eingesetzt werden. Konventionelle synthetische Minimalmedien können anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine und eine Kohlehydratquelle und Wasser enthalten. Beispielsweise kann es DMEM/HAM's F12-Medium sein. Der Gehalt an Soja- oder Hefeextrakt kann zwischen 0,1 und 100 g/l, besonders bevorzugt zwischen 1 und 5 g/l liegen. Als besonders bevorzugte Ausführungsform kann Sojaextrakt, beispielsweise Sojapepton verwendet werden. Das Molekulargewicht des Sojapeptons beträgt weniger als 50kD, bevorzugt weniger als 10kD.

Besonders bevorzugt wird ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: Synthetisches Minimalmedium (1 bis 25 g/l), Sojapepton (0,5 bis 50 g/l), L-Glutamin (0,05 bis 1 g/l), NaHCO_3 (0,1 bis 10 g/l), Ascorbinsäure (0,0005 bis 0,05 g/l), Ethanolamin (0,0005 bis 0,05 g/l), Na-Selenit (0,0001 bis 0,01 g/l). Dem Medium kann gegebenenfalls ein nichtionisches Oberflächenmittel wie etwa Polypropylenglycol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 oder PLURONIC F108) als

Entschäumer zugegeben werden.

Dieses Mittel wird allgemein angewendet, um die Zellen vor den negativen Auswirkungen der Belüftung zu schützen, da ohne Zugabe eines Oberflächenmittels die aufsteigenden und zerplatzenden Luftblasen zur Schädigung jener Zellen führen können, die sich an der Oberfläche dieser Luftblasen befinden ("sparging"), (Murhammer und Goochee, 1990, Biotechnol.Prog. 6:142-148)

Die Menge an nichtionischem Oberflächenmittel kann dabei zwischen 0,05 und 10 g/l liegen, besonders bevorzugt ist jedoch eine möglichst geringe Menge zwischen 0,1 und 5 g/l. Weiters kann das Medium auch Cyclodextrin oder ein Derivat davon enthalten.

Der Zusatz von nichtionischem Oberflächenmittel oder von Cyclodextrin ist jedoch nicht erfindungswesentlich. Vorzugsweise enthält das serum- und proteinfreie Medium einen Proteaseinhibitor, wie etwa Serinproteaseinhibitoren, die Gewebekultur-tauglich und synthetischen oder pflanzlichen Ursprungs sind.

Die Parameter für die Kultivierung der Zellen, wie O₂-Konzentration, Perfusionsgeschwindigkeit oder Mediumswechsel, pH, Temperatur und Kultivierungstechnik sind dabei abhängig von den jeweils eingesetzten Zelltypen und können vom Fachmann in einfacher Weise ermittelt werden. Beispielsweise kann die Kultivierung von CHO-Zellen in einem Rührtank und Perfusion mit proteinfreiem Medium mit einer Perfusionsrate von 1 bis 10 Volumenwechsel/Tag, einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,8, vorzugsweise bei 7,4, einer O₂-Konzentration zwischen 40% bis 60%, vorzugsweise bei 50%, und einer Temperatur zwischen 34°C und 38°C, vorzugsweise von 37°C, erfolgen.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons zur Verfügung, umfassend die Schritte der

- Vermehrung eines rekombinanten Ursprungsklons bis zur Zellkultur in serumhaltigem Medium, vorzugsweise ohne

Selektionsdruck

- Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten
- Klonieren der stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen, wobei die Klonierung durch allgemein bekannte Techniken, wie Vereinzeln der Zellen durch Ausverdünnen und Anzüchten der Einzelklone erfolgen kann
- Vermehrung der isolierten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen und
- gegebenenfalls Austesten der Zellkultur auf Produktproduzenten.

Dabei werden nur solche rekombinanten Zellklone als stabil angesehen, die für mindestens 10, vorzugsweise mindestens 20, und insbesondere mindestens 50 Generationen, in proteinfreiem Medium stabil rekombinantes Protein exprimieren.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons zur Verfügung, umfassend die Schritte

- Vermehren einer nicht-rekombinanten Ausgangszelle oder Zelllinie unter serum- und proteinfreien Bedingungen und Klonieren eines stabilen nicht-rekombinanten Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen
- Transfizieren des stabilen Zellklons mit einer rekombinanten Nukleinsäure und Isolieren von stabilen rekombinanten Zellklonen
- Kultivieren der stabilen Zellklon-Transfektanten in serum- und proteinfreiem Medium unter gegebenenfalls produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der stabilen rekombinanten Zellen auf Produktions- und Produktstabilität.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben, wobei sie jedoch nicht auf die Beispiele beschränkt ist.

Kurze Beschreibung der Figuren

Figur 1: zeigt die mikroskopische Aufnahme einer Arbeitszellbank eines Ursprungsklons zum Zeitpunkt der Umadaptierung von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium (A), nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium (B) und nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium (C).

Figur 2: zeigt die mikroskopische Aufnahme einer Zellkultur ausgehend von einem stabilen rekombinanten Zellklon unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf der Stufe der Arbeitszellbank (A), nach 10 Generationen (B) und nach 60 Generationen (C).

Figur 3: zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) FVIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

B e i s p i e l e :

B e i s p i e l 1 : Stabilität von rvWF-CHO-Zellen nach Umstellen von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium

CHO-dhfr⁻-Zellen wurden Plasmid phAct-rvWF und pSV-dhfr, co-transfiziert und vWF-exprimierende Klone, wie in Fischer et al. (1994, FEBS Letters 351:345-348) beschrieben, subkloniert. Von den Subklonen, die stabil rvWF exprimierten, wurde unter serumhaltigen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von MTX, eine Arbeitszellbank (Working cell bank, WCB) angelegt und die Zellen unter serumhaltigen Bedingungen auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®) immobilisiert. Nachdem eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml Trägermatrix erreicht wurde, erfolgte die Umstellung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium. Die Zellen wurden für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen

Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte bei der Arbeitszellbank vor der Mediumsumstellung, nach 10 und 60 Generationen im serum- und proteinfreiem Medium. Während die Arbeitszellbank noch 100% rvWF-Produzenten aufwies (Figur 1 A), sank der Anteil der rvWF-Produzenten nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium auf etwa 50% ab (Figur 1 B). Nach 60 Generationen wurden mehr als 95% der Zellen als Nicht-Produzenten identifiziert (Figur 1 C).

B e i s p i e l 2 : Klonierung von stabilen rekombinanten CHO-Klonen

Von der Zellkultur enthaltend rvWF-CHO-Zellen gemäß Beispiel 1, die für 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium kultiviert worden war (Figur 1 C), wurde eine Verdünnung angelegt und jeweils 0,1 Zellen/well einer Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM/HAM's F12 ohne Serum- oder Proteinzusätze und ohne Selektionsdruck für etwa 3 Wochen kultiviert und die Zellen mit Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern getestet. Ein als positiv identifizierter Zellklon wurde als Ausgangsklon für die Herstellung einer Saat-Zellbank eingesetzt. Von der Saat-Zellbank wurde eine Master-Zellbank (MCB) in serum- und proteinfreiem Medium angelegt und Einzelampullen für die weitere Herstellung einer Arbeitszellbank weggefroren. Ausgehend von einer Einzelampulle wurde eine Arbeitszellbank in serum- und proteinfreiem Medium hergestellt. Die Zellen wurden auf poröse Mikroträger immobilisiert und für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium auf Produktivität getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte auf der Stufe der Arbeitszellbank und nach 10 und 60 Generationen im serum- und proteinfreiem Medium. Sowohl auf Stufe der Arbeitszellbank (Figur 2 A), als auch nach 10 (Figur 2 B) und 60 Generationen (Figur 2 C) wurden annähernd 100% der Zellen als positive stabile rekombinante Klone identifiziert, die rvWF exprimieren.

B e i s p i e l 3 : Zellspezifische Produktivität der rekombinanten Zellklone

Von der definierten Stufe während der Kultivierung von rekombinanten Zellen wurde eine definierte Zellzahl entnommen und mit frischem Medium für 24 h inkubiert. Die rvWF:Risto-CoF-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen bestimmt. Tabelle 1 zeigt, daß die zellspezifische Produktivität bei den erfindungsgemäßen stabilen rekombinanten Zellklonen auch nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium stabil war, und sogar im Vergleich zum Ursprungsklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert war, erhöht war.

T a b e l l e 1:

Zellklon	zellspezifische Produktivität der Arbeitszellen mU rvWF/10 ⁶ Zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 10 Generationen mU rvWF/10 ⁶ Zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 60 Generationen mU rvWF/10 ⁶ Zellen/Tag
rvWF-CHO #808.68 Ursprungszellklon	55	30	< 10
r-vWF-CHO F7 *) stabiler Klone	62	65	60

*) hinterlegt gemäß Budapest Vertrag am 22.1.1998 (ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK);
Hinterlegungsnummer 98012206)

**B e i s p i e l 4 : Kultivierung von rFVIII-CHO Zellen in
protein- und serumfreiem Minimalmedium**

Eine Zellkultur enthaltend rFVIII-CHO-Zellen wurde in einem 10 l-Rührtank und Perfusion kultiviert. Dabei wurde ein serum- und proteinfreies Medium verwendet. Die Zellen wurden dabei auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®, Pharmacia) immobilisiert und für mindestens 6 Wochen kultiviert. Die Perfusionsrate betrug 4 Volumenwechsel/Tag, der pH-Wert lag bei 6,9-7,2, die O₂-Konzentration bei etwa 20-50% und die Temperatur bei 37°C.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) FVIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

T a b e l l e 2:

Kultivierungstage	Zellspezifische Produktivität (mU/10 ⁶ Zellen/Tag)	Immunfluoreszenz (% FVIII-positive Zellen)
15	702	n.a.
21	1125	n.a.
28	951	> 95%
35	691	> 95%
42	970	n.a.

Tabelle 2 zeigt die Stabilität und spezifische Produktivität der rFVIII-exprimierenden Zellen. Für diese Ergebnisse wurden nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen Proben entnommen, bei 300 g abzentrifugiert und in frischem serum- und proteinfreiem Medium resuspendiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Faktor VIII-Konzentration in den Zellkulturüberständen und die Zellzahl bestimmt. Ausgehend von diesen Daten wurde die spezifische FVIII-Produktivität berechnet.

Es wurde eine stabile durchschnittliche Produktivität von 888 mEinheiten/ 10^6 -Zellen/Tag erreicht. Diese stabile Produktivität wurde auch durch Immunfluoreszenz mit markierten anti-FVIII-Antikörpern nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen in serum- und proteinfreiem Medium bestätigt.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Rekombinanter Zellklon, dadurch gekennzeichnet, daß er in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50, Generationen stabil ist und rekombinantes Produkt exprimiert.
2. Zellklon nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er in isolierter Form vorliegt.
3. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er von einer rekombinanten Säugerzelle abgeleitet ist.
4. Zellklon nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Säugerzelle eine rekombinante CHO-Zelle oder BHK-Zelle ist.
5. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er die für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierenden Sequenzen enthält.
6. Zellklon nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein ein Blutfaktor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C oder einer aktivierten Form eines der Faktoren, oder vWF ist.
7. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die von Willebrand-Faktor exprimiert.
8. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII exprimiert.
9. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII und vWF co-exprimiert.

10. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, das die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor IX exprimiert.
11. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, das die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor II exprimiert.
12. Rekombinanter Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 11, erhältlich aus einer Zellkultur, die nach Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium und Umadaptierung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium erhalten wird, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten-Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen.
13. Zellkultur, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens 90%, vorzugsweise mehr als 95% stabile rekombinante Zellen enthält, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen für mehr als 50 Generationen stabil sind und rekombinantes Produkt exprimieren.
14. Zellkultur nach Anspruch 13 erhältlich durch Kultivieren eines stabilen rekombinanten Zellklons nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
15. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 oder 14 erhältlich durch die Schritte
 - Vermehren eines rekombinanten Ursprungsklons in serumhaltigem Medium,
 - Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien Bedingungen bis zur Zellkultur,
 - Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten,
 - Klonieren von stabilen Zellklonen unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
 - Vermehrung stabiler Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
16. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch ge-

kennzeichnet, daß die stabilen rekombinanten Zellen Säugierzellen sind.

17. Zellkultur nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Säuger-Zellen rekombinante CHO-Zellen, vorzugsweise CHO-DHFR⁻-Zellen, CHO-K1-Zellen oder BHK-Zellen sind.

18. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die stabilen Zellen eine für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierende Sequenz enthalten.

19. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen an einem Mikroträger immobilisiert sind.

20. Verfahren zur großtechnischen Herstellung eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen umfassend die Schritte

- Bereitstellen eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
- Vermehrung des stabilen Zellklons in serum- und proteinfreiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur,
- Herstellung der Zellkultur enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor, und
- Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das serum- und proteinfreie Medium ein synthetisches Minimalmedium enthaltend ein Hefe- oder Sojaextrakt ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß das serum- und proteinfreie Medium einen Proteaseinhibitor enthält.

23. Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons umfassend die Schritte

- Vermehren eines rekombinanten Ursprungsklon bis zur Zellkultur in serumhaltigem Medium,
- Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien produktionsäquivalenten Bedingungen,
- Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten,
- Klonieren der unter serum- und proteinfreien Bedingungen stabilen rekombinanten Zellklone und
- Vermehrung der stabilen Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen.

24. Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons umfassend die Schritte

- Vermehren einer nicht-rekombinanten Ausgangszelle unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
- Klonieren eines stabilen nicht-rekombinanten Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
- Transfizieren des stabilen Zellklons mit einer rekombinanten Nukleinsäure und Isolieren von stabilen Transfektanten,
- Kultivieren der Transfektanten in serum- und proteinfreiem Medium unter produktionsäquivalenten Bedingungen und
- Testen der Zellen auf Produktionsstabilität.

25. Serum- und proteinfreies synthetisches Medium bestehend aus Minimalmedium, Sojaepton, Glutamin, Natriumhydrogencarbonat, Ascorbinsäure, Ethanolamin und Natrium-Selenit.

26. Medium nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Minimalmedium anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine und eine Kohlenhydratquelle enthält.

27. Zellkultur in einem serum- und proteinfreien Medium nach Anspruch 25 oder 26.

28. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids in einer Zellkultur, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte umfaßt:

- Vermehren eines stabilen Zellklons in serum- und protein-freiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur.
- Herstellen der Zellkultur enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor und
- Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Polypeptid ein Blutfaktor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C oder Polypeptid mit deren Aktivität oder einer aktivierten Form eines der Faktoren oder vWF ist.

30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die von Willebrand-Faktor oder ein Polypeptid mit vWF-Aktivität exprimiert.

31. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII oder ein Polypeptid mit Faktor VIII-Aktivität exprimiert.

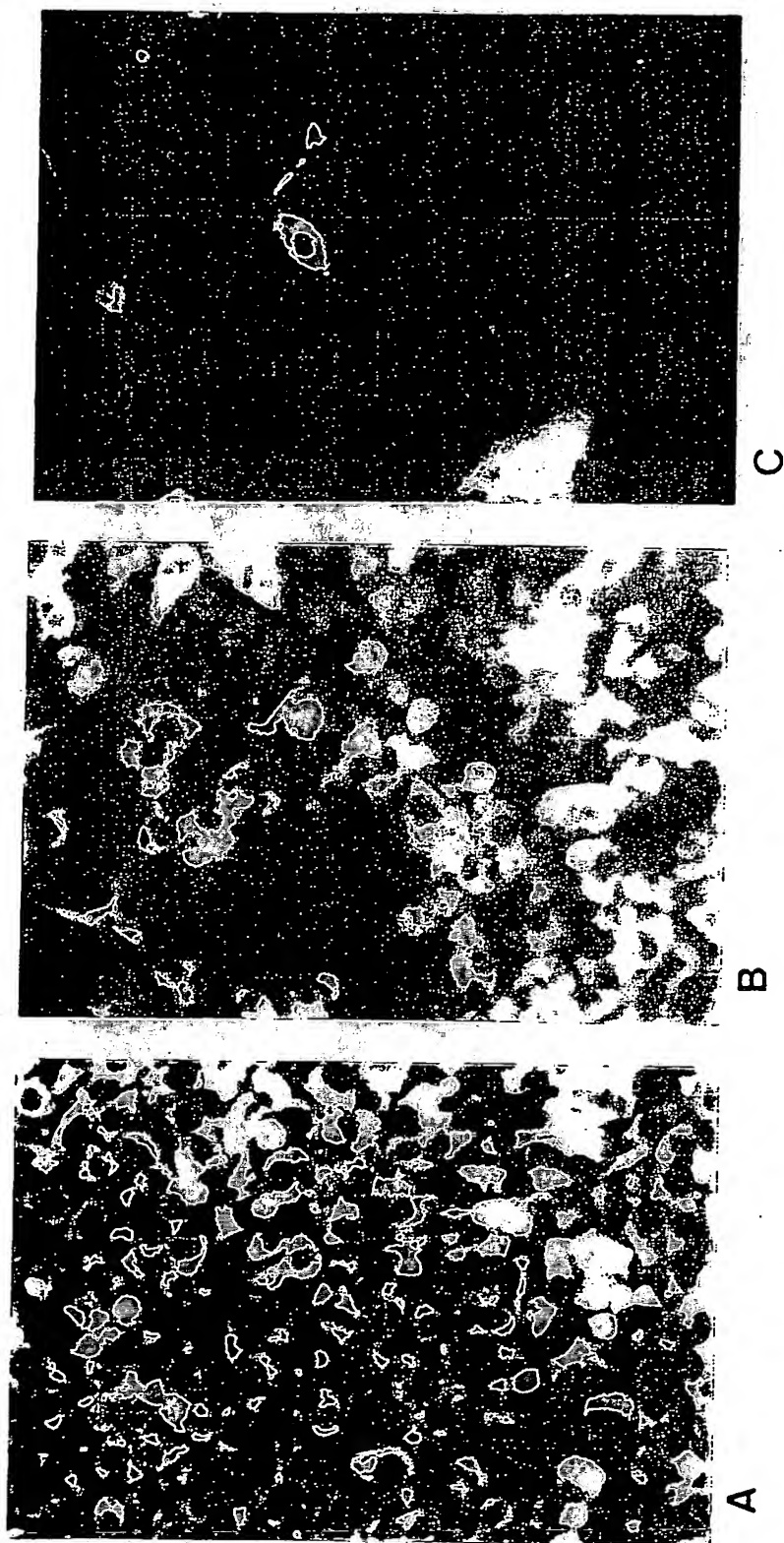
32. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII und vWF co-exprimiert.

33. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor IX exprimiert.

34. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor II exprimiert.

BEST AVAILABLE COPY

Fig. 1



BEST AVAILABLE COPY

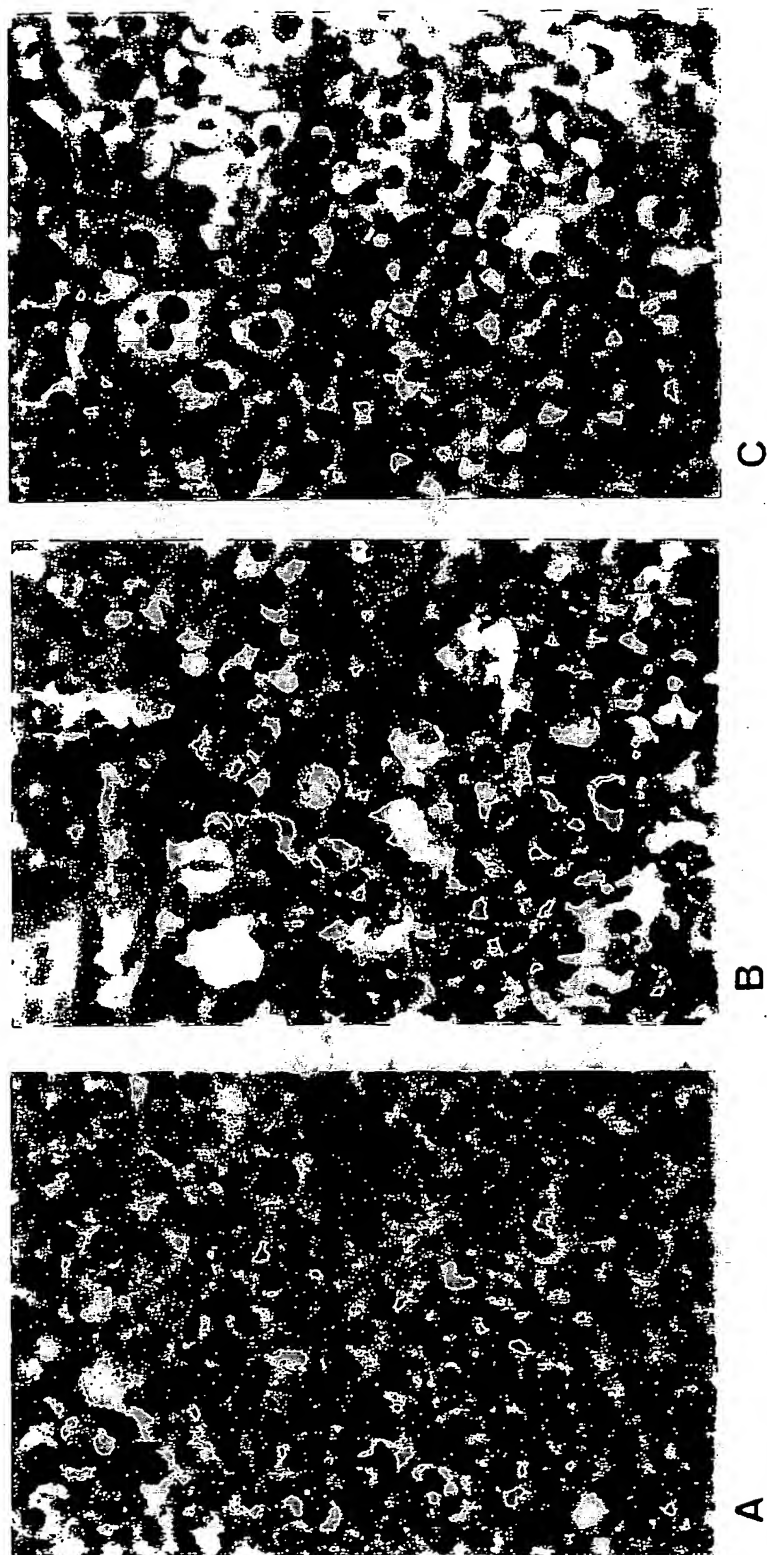
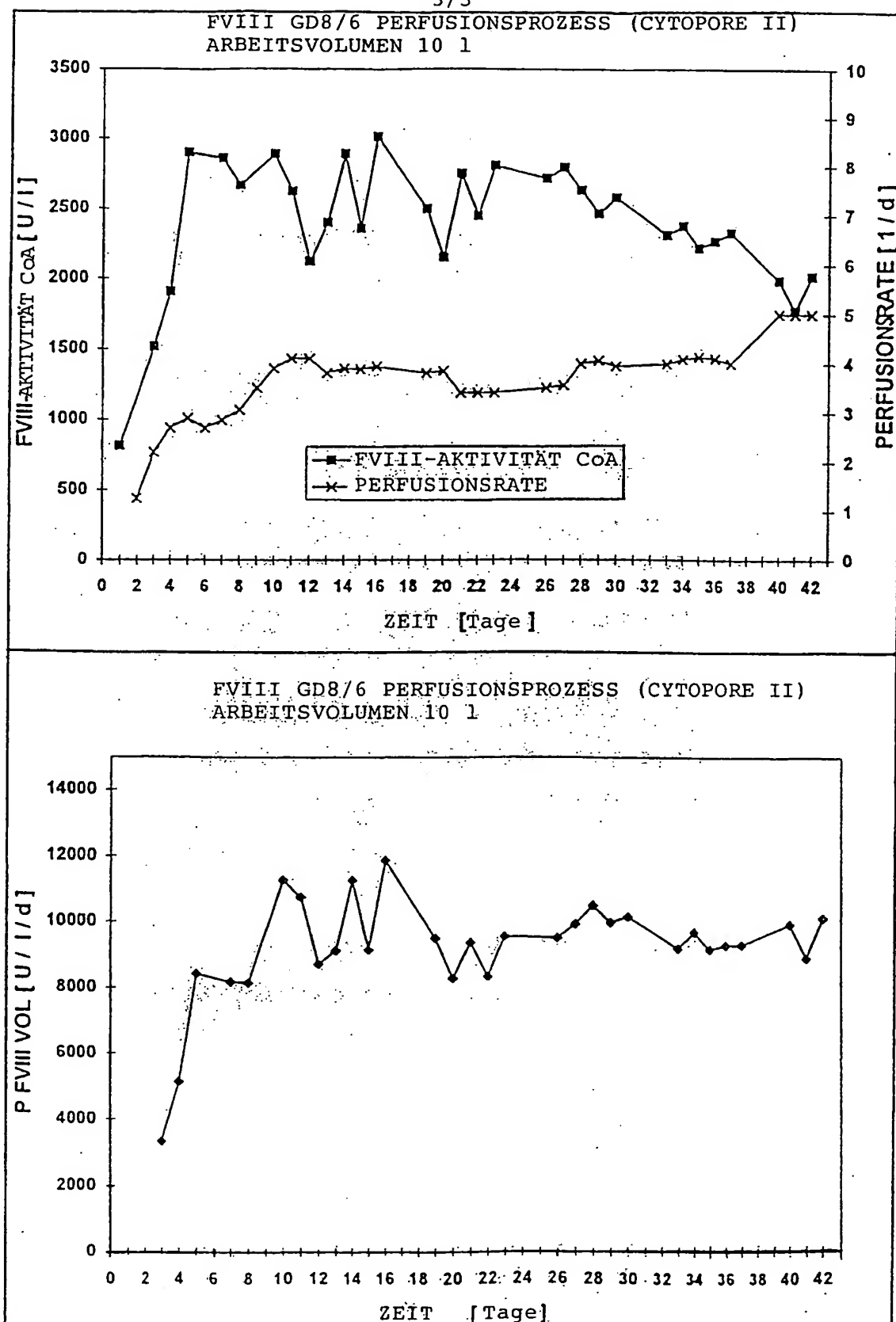


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/AT 99/00197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/10 C12P21/02 C12N9/64 C07K14/745

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 05240 A (GRAY PETER PHILIP ;UNISEARCH LTD (AU); COMMW SCIENT IND RES ORG (A) 13 February 1997 (1997-02-13) cited in the application page 1, line 4 - line 10 page 5, line 1 - line 3 page 8, line 30 -page 9, line 4 page 21, line 6 - line 16 page 23, line 19 -page 24, line 14 claims 1,7,13,18,25-29,42,43 ---	1-5, 12-20, 23,28
X	EP 0 666 312 A (RENNER WOLFGANG A ;BAILEY JAMES E (CH); EPPENBERGER HANS M (CH)) 9 August 1995 (1995-08-09) the whole document --- -/--	1-5, 12-18,23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 99/00197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZANG M ET AL: "PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING A PROTEIN-FREE CELL CULTURE MEDIUM" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 13, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 389-392. XP002032677 ISSN: 0733-222X the whole document	1-5, 12-18, 20,23,28
X	WO 96 18734 A (CIBA GEIGY AG ;OOSTRUM JAN VAN (CH); ASSELBERGS FREDERICUS ALPHONS) 20 June 1996 (1996-06-20) page 15. line 16 -page 16. line 2 page 18. line 5 -page 19. line 14 claims 1,3,11	1-5, 12-18, 20,23, 24,28
X	US 5 633 162 A (KEEN MICHAEL J ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27)	25-27
A	the whole document in particular Table 1, column 6 line 33 - line 38 , claim 17	20,21
X	HARANT H ET AL: "Two-dimensional electrophoresis as a tool for control of quality and consistency in production systems using animal cells" CYTOTECHNOLOGY, vol. 6. 1992. pages 119-127. XP002140916 the whole document	1-5
X	KATINGER. H. ET AL: "Long-term stability of continuously perfused animal cells immobilized on novel macroporous microcarriers" ADV. MOL. CELL BIOL. (1996). 15A(BIOCHEMICAL TECHNOLOGY), 193-207 , XP000914905	1-5,13, 14, 18-20,28
Y	the whole document	6-11, 29-34
Y	FISCHER. BERNHARD ET AL: "Comparison of N-glycan pattern of recombinant human coagulation factors II and IX expressed in chinese hamster ovary (CHO) and African green monkey (Vero) cells" J. THROMB. THROMBOLYSIS (1996), 3(1), 57-62 , XP000914907 the whole document	6,10,11, 29,33,34

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 99/00197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FISCHER B ET AL: "Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero- and homo-dimers" FEBS LETTERS, vol. 351, 1994, pages 345-348, XP002140917 cited in the application the whole document ---	6,7,29, 30
Y	KAUFMAN RJ ET AL: "Effect of von Willebrand Factor coexpression on the synthesis and secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 9, no. 3, 1989, pages 1233-1242, XP002140918 the whole document ---	6-9, 29-32
A	US 5 851 800 A (LIE KRISTINA LIMA ET AL) 22 December 1998 (1998-12-22) column 3, line 60 -column 4, line 29 column 6, line 51 -column 9, line 12 claims 1,11-19 ---	22
A	WO 96 15231 A (IMMUNO AG ;BARRETT NOEL (AT); KISTNER OTFRIED (AT); MUNDT WOLFGANG) 23 May 1996 (1996-05-23) cited in the application page 23, line 31 -page 27, line 27 page 33, line 4 - line 28 claims 41-44 -----	24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Interr. Application No

PCT/AT 99/00197

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705240 A	13-02-1997	AU 704095 B	15-04-1999
		AU 6510196 A	26-02-1997
		CA 2227789 A	13-02-1997
		EP 0843722 A	27-05-1998
		JP 11509734 T	31-08-1999
EP 0666312 A	09-08-1995	US 5811299 A	22-09-1998
WO 9618734 A	20-06-1996	AU 4302796 A	03-07-1996
		EP 0799310 A	08-10-1997
		JP 10511082 T	27-10-1998
US 5633162 A	27-05-1997	US 5316938 A	31-05-1994
		AU 645615 B	20-01-1994
		AU 8591591 A	07-05-1992
		CA 2053586 A	18-04-1992
		EP 0481791 A	22-04-1992
		JP 2625302 B	02-07-1997
		JP 6070757 A	15-03-1994
		NZ 240248 A	25-11-1994
		ZA 9108249 A	16-04-1993
US 5851800 A	22-12-1998	AU 716245 B	24-02-2000
		AU 2919797 A	05-12-1997
		EP 0934424 A	11-08-1999
		NO 985297 A	14-01-1999
		WO 9743436 A	20-11-1997
WO 9615231 A	23-05-1996	US 5753489 A	19-05-1998
		US 5756341 A	26-05-1998
		CA 2205015 A	23-05-1996
		EP 0791055 A	27-08-1997
		FI 971998 A	09-05-1997
		JP 10503093 T	24-03-1998
		US 5698433 A	16-12-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/10 C12P21/02 C12N9/64 C07K14/745

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 05240 A (GRAY PETER PHILIP ; UNISEARCH LTD (AU); COMMW SCIENT IND RES ORG (A) 13. Februar 1997 (1997-02-13) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 4 - Zeile 10 Seite 5, Zeile 1 - Zeile 3 Seite 8, Zeile 30 - Seite 9, Zeile 4 Seite 21, Zeile 6 - Zeile 16 Seite 23, Zeile 19 - Seite 24, Zeile 14 Ansprüche 1,7,13,18,25-29,42,43	1-5, 12-20, 23,28
X	EP 0 666 312 A (RENNER WOLFGANG A ; BAILEY JAMES E (CH); EPPENBERGER HANS M (CH)) 9. August 1995 (1995-08-09) das ganze Dokument --- -/-	1-5, 12-18,23

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ZANG M ET AL: "PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING A PROTEIN-FREE CELL CULTURE MEDIUM" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, Bd. 13, 1. April 1995 (1995-04-01), Seiten 389-392, XP002032677 ISSN: 0733-222X das ganze Dokument	1-5, 12-18, 20,23,28
X	WO 96 18734 A (CIBA GEIGY AG ;OOSTRUM JAN VAN (CH); ASSELBERGS FREDERICUS ALPHONS) 20. Juni 1996 (1996-06-20) Seite 15, Zeile 16 -Seite 16, Zeile 2 Seite 18, Zeile 5 -Seite 19, Zeile 14 Ansprüche 1,3,11	1-5, 12-18, 20,23, 24,28
X	US 5 633 162 A (KEEN MICHAEL J ET AL) 27. Mai 1997 (1997-05-27)	25-27
A	das ganze Dokument insbesondere Tabelle 1, Spalte 6 Zeile 33 - Zeile 38, Anspruch 17	20,21
X	HARANT H ET AL: "Two-dimensional electrophoresis as a tool for control of quality and consistency in production systems using animal cells" CYTOTECNOLOGY, Bd. 6, 1992, Seiten 119-127, XP002140916 das ganze Dokument	1-5
X	KATINGER, H. ET AL: "Long-term stability of continuously perfused animal cells immobilized on novel macroporous microcarriers" ADV. MOL. CELL BIOL. (1996), 15A(BIOCHEMICAL TECHNOLOGY), 193-207 , XP000914905	1-5,13, 14, 18-20,28
Y	das ganze Dokument	6-11, 29-34
Y	FISCHER, BERNHARD ET AL: "Comparison of N-glycan pattern of recombinant human coagulation factors II and IX expressed in chinese hamster ovary (CHO) and African green monkey (Vero) cells" J. THROMB. THROMBOLYSIS (1996), 3(1), 57-62 , XP000914907 das ganze Dokument	6,10,11, 29,33,34

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FISCHER B ET AL: "Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero- and homo-dimers" FEBS LETTERS, Bd. 351, 1994, Seiten 345-348, XP002140917 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	6,7,29, 30
Y	KAUFMAN RJ ET AL: "Effect of von Willebrand Factor coexpression on the synthesis and secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 9, Nr. 3, 1989, Seiten 1233-1242, XP002140918 das ganze Dokument	6-9, 29-32
A	US 5 851 800 A (LIE KRISTINA LIMA ET AL) 22. Dezember 1998 (1998-12-22) Spalte 3, Zeile 60 -Spalte 4, Zeile 29 Spalte 6, Zeile 51 -Spalte 9, Zeile 12 Ansprüche 1,11-19	22
A	WO 96 15231 A (IMMUNO AG ;BARRETT NOEL (AT); KISTNER OTFRIED (AT); MUNDT WOLFGANG) 23. Mai 1996 (1996-05-23) in der Anmeldung erwähnt Seite 23, Zeile 31 -Seite 27, Zeile 27 Seite 33, Zeile 4 - Zeile 28 Ansprüche 41-44	24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Innen :ares Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9705240 A	13-02-1997	AU 704095 B	15-04-1999
		AU 6510196 A	26-02-1997
		CA 2227789 A	13-02-1997
		EP 0843722 A	27-05-1998
		JP 11509734 T	31-08-1999
EP 0666312 A	09-08-1995	US 5811299 A	22-09-1998
WO 9618734 A	20-06-1996	AU 4302796 A	03-07-1996
		EP 0799310 A	08-10-1997
		JP 10511082 T	27-10-1998
US 5633162 A	27-05-1997	US 5316938 A	31-05-1994
		AU 645615 B	20-01-1994
		AU 8591591 A	07-05-1992
		CA 2053586 A	18-04-1992
		EP 0481791 A	22-04-1992
		JP 2625302 B	02-07-1997
		JP 6070757 A	15-03-1994
		NZ 240248 A	25-11-1994
		ZA 9108249 A	16-04-1993
US 5851800 A	22-12-1998	AU 716245 B	24-02-2000
		AU 2919797 A	05-12-1997
		EP 0934424 A	11-08-1999
		NO 985297 A	14-01-1999
		WO 9743436 A	20-11-1997
WO 9615231 A	23-05-1996	US 5753489 A	19-05-1998
		US 5756341 A	26-05-1998
		CA 2205015 A	23-05-1996
		EP 0791055 A	27-08-1997
		FI 971998 A	09-05-1997
		JP 10503093 T	24-03-1998
		US 5698433 A	16-12-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.